

·实验研究 Experimental research·

SD 大鼠 McA-RH7777 细胞系肝癌模型构建及其特点

管 阳, 刘凤永, 樊庆胜, 付金鑫, 陈现现, 李 鑫, 袁宏军, 王茂强

【摘要】 目的 研究 SD 大鼠 McA-RH7777 细胞系肝细胞肝癌(HCC)模型构建及其相关瘤体生长、检测指标及影像学特点,评价该模型构建方法可行性和模型稳定性。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为实验组(A 组, $n=30$, 肝脏注射种植 McA-RH7777 细胞 0.2 mL)、空白对照组(B 组, $n=10$, 肝脏单纯注射等量 0.9%氯化钠溶液)。A 组大鼠开腹手术后 7、14、21 d 分别接受 MR 和增强 CT 检查并测量瘤体长径。手术后 7、14、21 d, 分别随机取 A、B 组 10、3 只大鼠麻醉, 经颈静脉取血检测碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酐(Crea)、尿素(Urea); 放血法处死大鼠, HE 染色和 VEGF 免疫组化检测肿瘤组织形态。**结果** A 组 27 只(90%)大鼠成功成瘤, 7、14、21 d 时瘤体长径分别为 (9.4 ± 2.6) mm、 (20.6 ± 4.3) mm、 (17.4 ± 1.2) mm; 成瘤大鼠 CT 平扫可见肝脏内低密度病灶, 增强 CT 显示病灶环形强化, MR 提示病灶 T1 加权为低信号, T2 加权为高信号, 弥散加权成像(DWI)为高信号。两组 7、14、21 d 血液 ALP、ALT、AST、Crea、Urea 检测结果比较, 差异均无统计学意义($P<0.05$)。HE 染色和 VEGF 免疫组化检测结果均提示肿瘤组织形态。**结论** SD 大鼠 McA-RH7777 细胞系 HCC 模型是可行、稳定、安全的。

【关键词】 动物模型; 动物实验; 肝细胞肝癌; McA-RH7777 细胞

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2018)-06-0549-05

The establishment of SD rat McA-RH7777 cell hepatocellular carcinoma model and its characteristics

GUAN Yang, LIU Fengyong, FAN Qingsheng, FU Jinxin, CHEN Xianxian, LI Xin, YUAN Hongjun, WANG Maoqiang. Department of Interventional Radiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Fengyong, E-mail: fengyongliu@aliyun.com

【Abstract】 Objective To study the establishment of SD rat McA-RH7777 cell hepatocellular carcinoma (HCC) model, to discuss its characteristics, including tumor growth, detection index and imaging features, and to evaluate the feasibility of the model building method as well as the model stability. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into group A (experiment group, $n=30$) and group B (blank control group, $n=10$). The rats of group A received liver injection of 0.2 mL of McA-RH7777 cell suspension, while the rats of group B received liver injection of 0.2 mL of saline. Rats in group A were examined with MRI and contrast-enhanced CT scan at 7, 14 and 21 days after laparotomy, and measurement of the long diameter of the tumor was conducted at the same time. Every randomly selected 10 rats in group A and 3 rats in group B were anesthetized each time at 7, 14 and 21 days after laparotomy, and jugular vein blood sampling was carried out to test the alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (Crea) and urea levels. Then, the rats were sacrificed by using depletion method. HE staining and VEGF immunohistochemistry were used to observe tumor morphology. **Results** In group A, 27 rats (90%) succeeded in tumor formation. The mean long diameters of tumor at 7, 14 and 21 days after laparotomy were (9.4 ± 2.6) mm, (20.6 ± 4.3) mm and (17.4 ± 1.2) mm respectively. On plain CT scan, low-density

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.06.012

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671800)、北京市自然科学基金面上项目(7172204)

作者单位: 100853 北京 解放军总医院介入放射科(管 阳现在武警部队四川省总队医院放射科工作)

通信作者: 刘凤永 E-mail: fengyongliu@aliyun.com

lesions in the liver were detected, while on contrast-enhanced CT scan annular enhancement of lesion could be observed. MRI examination showed that on T1WI the lesions were characterized by low signal intensity, on T2WI the lesions presented as high signal intensity, and on diffusion-weighted imaging (DWI) the lesions were manifested as high signal intensity. No statistically significant differences in serum levels of ALP, ALT, AST, Crea and Urea tested at 7, 14 and 21 days after laparotomy existed between the two groups ($P < 0.05$). The results of HE staining and VEGF immunohistochemical staining indicated that the tissues possessed typical tumor morphology. **Conclusion** For the establishment of SD rat HCC model, liver injection of McA-RH7777 cell suspension is feasible and safe, and the model stability is satisfactory. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 549-553)

【Key words】 animal model; animal experiment; hepatocellular carcinoma; McA-RH7777 cell

肝细胞肝癌(HCC)发病率在全球恶性肿瘤中位于第6位,在所有肿瘤致死原因中占第3位^[1]。由于广泛的乙型、丙型肝炎病毒人群基础,亚洲国家每年新发HCC占全球60万患者中78%^[2]。HCC治疗仍为肿瘤治疗重点和难点,新治疗方法层出不穷^[3]。临床应用前动物实验在新型治疗方法研究中具有重要意义,介入治疗已成为重要方法,随着介入材料精细化,在体型较小动物体内实施介入操作成为可能。HCC动物模型中同种移植性大鼠模型因可重复性强、稳定性好、造模周期短、经济成本低,在动物实验中具有较大优势^[4-8]。除裸鼠外,由于正常大鼠自身免疫功能健全,同种异体移植HCC模型有一定成瘤率,目前国内较常见大鼠模型为Walker-256模型,也有CBRH-7919细胞株建模报道^[9]。大鼠McA-RH7777细胞系HCC模型研究在国内少有报道。本研究采用McA-RH7777细胞构建大鼠HCC模型,现将相关操作细节、模型瘤体生长特点、检测指标、影像学特点以及建模可行性和稳定性,报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞系培养与实验动物

McA-RH7777细胞系由美国菌种保藏中心(ATCC)典藏(CRL-1601),上海榕柏生物技术公司提供。McA-RH7777细胞培养方法:高糖DMEM培养基(美国Corning公司)中加入10%胎牛血清(美国Corning公司)成为完全培养基,加入1%双抗(美国Corning公司),并置于150 mm²培养皿(美国Corning公司),在37℃、5%CO₂细胞培养箱(解放军总医院肿瘤中心实验室)中培养。

实验动物为Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠(北京维通利华实验动物技术公司),体重(315±17) g,饲养条件为解放军总医院动物实验中心无特定病

原体(SPF)级。本实验经医院实验动物福利伦理委员会审查批准。

1.2 建模方法

1%戊巴比妥(3 mL/kg)腹腔注射SD大鼠,剃除腹部毛发,聚维酮碘消毒手术区域后铺无菌单,剑突处下方行腹正中切口,暴露肝脏,选择肝右叶一处注射点;将处于对数增殖期McA-RH7777细胞(图1)重悬于磷酸缓冲液(PBS)中,注射前经锥虫蓝染色确认McA-RH7777细胞活性,将4×10⁶种植细胞溶于0.2 mL PBS,以1 mL注射器缓慢推注入肝脏,完成后静置5 min;拔针后以医用棉签压迫注射点,确认无渗血渗液后逐层关腹缝合,送回饲养笼中观察。术后肌内注射青霉素钠80万U/d,连续3 d。术前1 d至术后3 d肌内注射地塞米松磷酸钠(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。

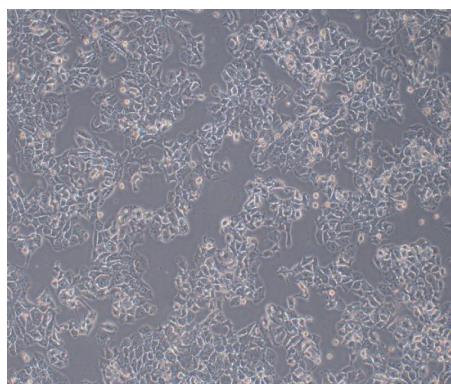


图1 对数增殖期McA-RH7777细胞镜下观

1.3 实验分组

40只SD大鼠随机分为实验组(A组, $n=30$, 按照上述建模法在肝脏注射种植McA-RH7777细胞0.2 mL)、空白对照组(B组, $n=10$, 按照上述建模法在肝脏仅注射等量0.9%氯化钠溶液)。

1.4 影像学检查

A组大鼠开腹手术后7、14、21 d分别接受MR

和增强 CT 检查。MR 检查序列包括 T1 加权成像、T2 加权成像、弥散加权成像(DWI)。增强 CT 检查应用碘普罗胺,0.9%氯化钠溶液稀释 1 倍后经尾静脉注射 1 mL,动脉期于对比剂注射后 4 s 开始扫描。根据成瘤情况,每次检查以 T2 加权像检测成瘤大鼠瘤体长径。

1.5 血液指标、病理及免疫组化检测

开腹手术后 7、14、21 d,A、B 组分别随机取 10、3 只大鼠麻醉,经颈静脉取血,检测碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酐(Crea)、尿素(Urea)。放血法处死大鼠,根据成瘤情况取出肿瘤组织,作苏木精-伊红(HE)染色、血管内皮细胞生长因子(VEGF)免疫组化染色并测定积分光密度(IOD)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据作统计学处理,以

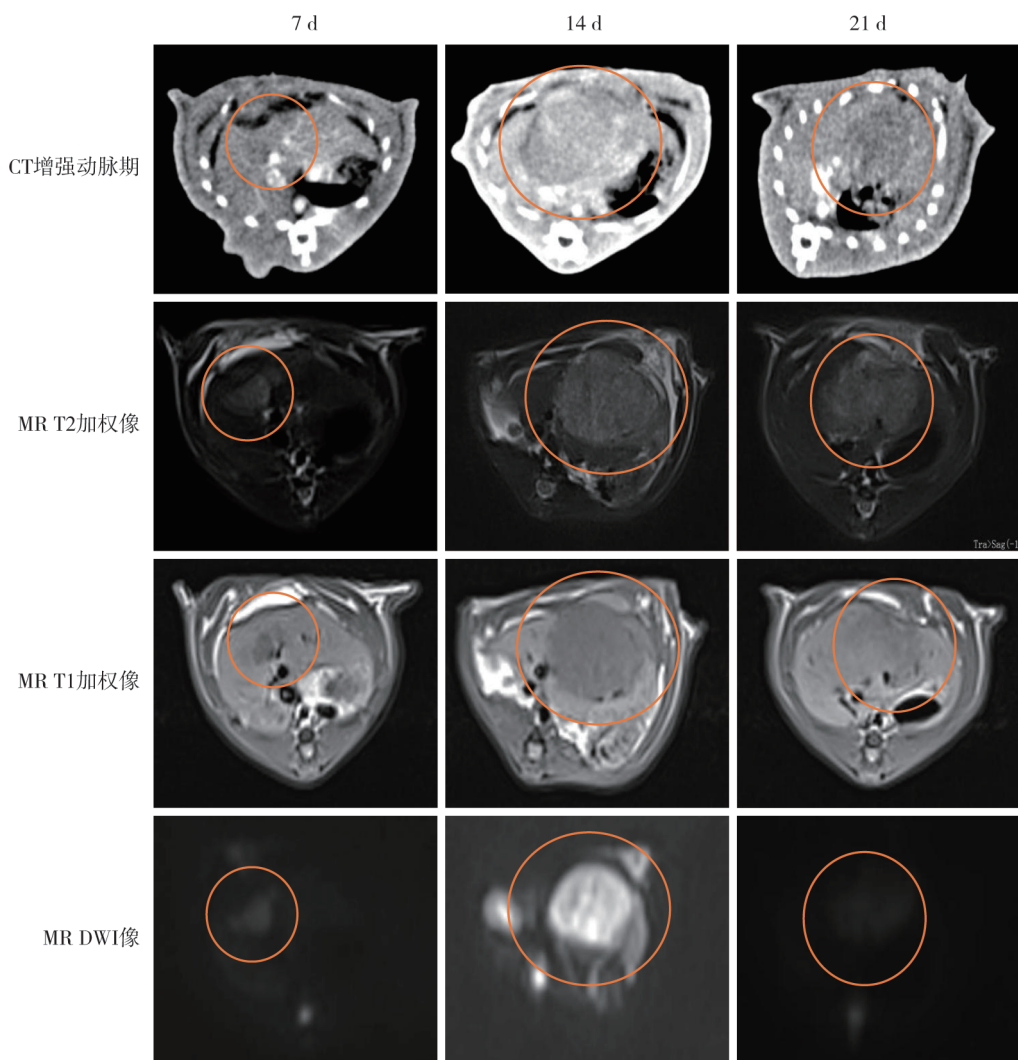
均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料比较用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 成瘤情况和影像学检查

A、B 组大鼠开腹行肝脏 McA-RH7777 细胞注射种植和单纯 0.9%氯化钠溶液注射操作均获成功,术后无大鼠死亡及其它意外事件。根据大鼠处死后解剖探查肝脏情况,A 组 27 只(90%)成功成瘤。

A 组成瘤大鼠 CT 平扫检查可见肝脏内低密度病灶,CT 增强检查可见病灶动脉期环形强化;MR 检查可见病灶 T1 加权为低信号,T2 加权为高信号,DWI 为高信号(图 2)。7、14、21 d 时瘤体长径分别为(9.4 ± 2.6) mm、(20.6 ± 4.3) mm、(17.4 ± 1.2) mm,差异有显著统计学意义($P<0.000 1$)(图 3)。



CT 增强示病灶动脉期环形强化;MR 检查可见病灶 T2 加权为高信号,T1 加权为低信号,DWI 为高信号

图 2 A 组成瘤大鼠影像学表现

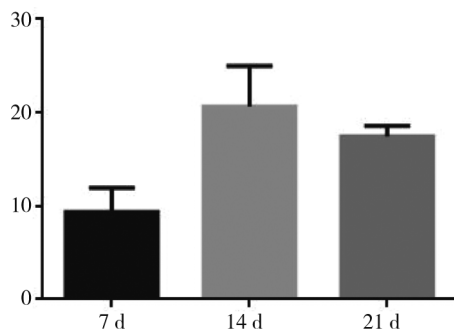


图3 A组成瘤大鼠瘤体长径

2.2 血液指标检测

A、B组大鼠术后7、14、21 d血液ALP、ALT、AST、Crea、Urea检测结果比较,差异均无统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.3 病理及免疫组化检测

A组成瘤大鼠术后7、14 d HE染色镜下可见肿瘤细胞呈大的多边形、类圆形,胞核大、核仁明显、核分裂像易见,有明显的细胞异型性,肿瘤细胞排列成宽条索状,其间薄层纤维组织分割,组织中有

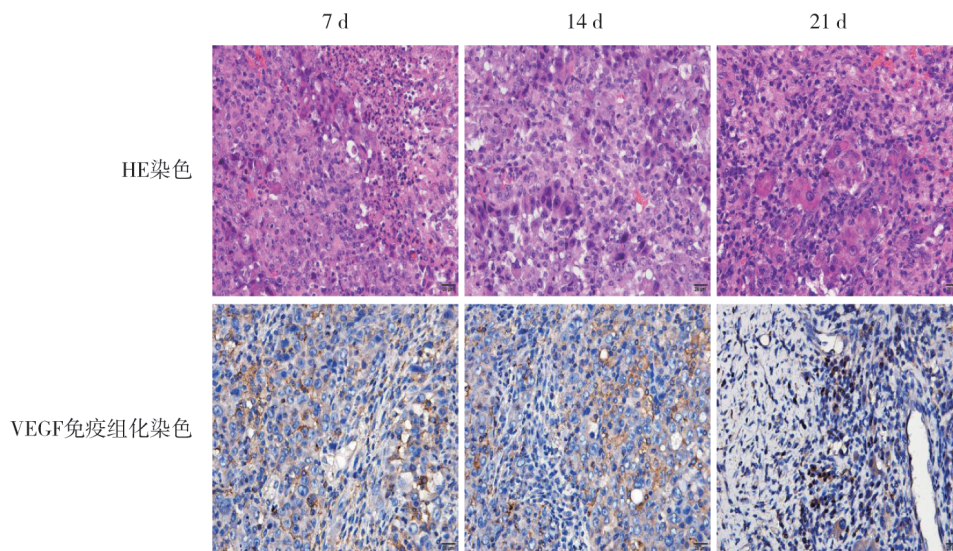
表1 两组大鼠术后血液指标检测结果比较

 $\bar{x} \pm s$

指标	7 d			14 d			21 d		
	A组	B组	P值	A组	B组	P值	A组	B组	P值
ALP/(U/L)	120.7±40.1	102.0±34.5	0.527	47.2±8.2	40.5±10.3	0.327	51.6±28.0	82.9±3.8	0.104
ALT/(U/L)	68.1±39.8	64.0±23.2	0.879	49.3±25.8	62.2±34.0	0.539	52.9±30.4	44.2±9.8	0.654
AST/(U/L)	97.3±34.7	80.7±25.6	0.490	49.1±30.0	55.7±53.5	0.814	47.6±21.5	60.2±31.9	0.497
Crea/(μmol/L)	26.0±5.3	20.9±3.6	0.181	26.2±3.9	30.3±6.9	0.267	36.1±6.9	25.0±5.7	0.052
Urea/(mmol/L)	5.7±0.7	6.2±1.6	0.492	5.7±1.2	7.7±1.5	0.063	5.4±1.4	5.0±1.1	0.689

少量坏死和血管,无明显炎细胞浸润;术后21 d肿瘤组织中度坏死,可见少量炎细胞浸润及中量纤维组织。VEGF免疫组化检测显示,A组术后7、14、

21 d IOD 值分别为(27 233.32±5 107.20)、(37 549.71±3 248.06)、(8 113.43±1 156.70),差异有显著统计学意义($P = 0.003$)(图4)。



术后7、14 d HE染色可见肿瘤细胞生长旺盛,免疫组化可见 VEGF 染色较丰富;术后21 d HE染色可见肿瘤组织内部坏死灶,免疫组化可见 VEGF 染色匮乏

图4 A组病理及免疫组化检测镜下所见

3 讨论

目前国内较常用的大鼠肝癌模型为 Walker-256 模型,Walker-256 瘤株原位移植后能较好地模拟人肝癌膨胀性和浸润性生长方式。但该瘤株来源于大鼠自发性乳腺癌,具有部分肉瘤性质,不是真正来源于 HCC。McA-RH7777 细胞为 Buffalo 大鼠 HCC 来源。有国内学者报道过采用 McA-RH7777 细胞在 Buffalo 大鼠成瘤建模^[10],也有国外学者报道过注射环孢素 A 后采用 McA-RH7777 细胞在 SD 大

鼠成瘤建模^[11]。相比之下,国内 SD 大鼠较 Buffalo 大鼠购买渠道更方便且经济,地塞米松较环孢素 A 成本更经济,在注射地塞米松基础上选用 SD 大鼠接种 McA-RH7777 大鼠 HCC 造模,成本低廉、成瘤率高、更符合 HCC 生物学特点,具有一定优势。

从影像学检查结果看,该模型瘤体生长情况可通过 CT 和 MR 监测和评价,其影像学特点为 CT 平扫可见肝脏内低密度病灶,CT 增强可见动脉期病灶环形强化,MR 检查可见病灶 T1 加权为低信号,T2

加权为高信号,DWI 为高信号,均符合典型肿瘤影像学特点。然而可能由于移植性肿瘤的缘故,增强 CT 结果为环形强化,这与兔 VX2 肝癌模型上所见相同^[12-14]强化方式与临床上典型原发性 HCC 强化特点有所不同,类似肝转移瘤强化方式。本实验观察 21 d 内瘤体长径变化,发现肿瘤于种瘤后 14 d 内生长速度较快,长径能达到 2 cm 左右,21 d 时长径较 14 d 普遍有所缩小,但仍有部分大鼠持续增长。术后 21 d 肿瘤组织 HE 染色和 VEGF 免疫组化检测结果与瘤体长径变化相对应;术后 7、14 d HE 染色可见肿瘤细胞生长旺盛,免疫组化可见 VEGF 染色较丰富,21 d HE 染色可见肿瘤组织内部坏死灶,免疫组化可见 VEGF 染色匮乏。如同大多数大鼠移植性肝癌模型,大鼠 McA-RH7777 细胞系 HCC 模型肿瘤具有自限性回缩现象,这与大鼠自身免疫性功能有关^[15]。建模 14 d 内肿瘤可生长至峰值,21 d 内部分大鼠肿瘤因自身免疫自限性开始出现回缩现象,病理检查结果也显示肿瘤活性于 14 d 后下降,生长不良。因此,该动物模型仅适用于针对 HCC 治疗的短期研究(1~2 周观察 HCC 生长情况),长期研究则因肿瘤免疫自限性会影响研究结果评判。本实验两组大鼠术后 7、14、21 d 血液 ALP、ALT、AST、Crea、Urea 间差异无统计学意义($P>0.05$),表明 21 d 内该模型大鼠肝、肾功能未发生差异性改变,因此是安全的,不会对基础动物实验结果评价造成影响。

构建 SD 大鼠 McA-RH7777 细胞系 HCC 模型过程中,需要注意如下操作细节:①尽量缩短肿瘤细胞离开培养基至注入肝内的时间,确保注射入肝脏时肿瘤细胞活性。②肝脏原位注射肿瘤细胞时确保进针深度,不可过浅,否则易使肝包膜破裂;不可过深,否则易刺穿肝脏至肝外。注射过程中针头确保固定,缓慢推注,完成后静置 5 min 再抽针,确保肿瘤细胞沉淀在肝内,并用棉签压住穿刺点片刻,确保无外渗和出血,以免造成动物死亡而造模失败。③整个建模术中确保无菌条件,术后给予抗生素肌肉注射,避免创口感染,确保成瘤成功率。

综上所述,SD 大鼠原位注射 McA-RH7777 细胞构建 HCC 模型是可行、稳定、安全的,适用于针对 HCC 治疗的短期研究。

[参考文献]

[1] Waller LP, Deshpande V, Pyrsopoulos N. Hepatocellular

- carcinoma: a comprehensive review[J]. World J Hepatol, 2015, 7: 2648-2663.
- [2] Poon D, Anderson BO, Chen LT, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009[J]. Lancet Oncol, 2009, 10: 1111-1118.
- [3] Dutta R, Mahato RI. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy[J]. Pharmacol Ther, 2017, 173: 106-117.
- [4] 初金哲,王黎洲,张帅,等.改良的经大鼠胃十二指肠动脉逆行肝动脉插管实验研究[J].介入放射学杂志,2016,25: 798-802.
- [5] 顾伟,沈婕,韩克起,等.大鼠肝癌模型经肝动脉改良给药技术的建立[J].介入放射学杂志,2006,15: 41-43.
- [6] Chen R, Sain NM, Harlow KT, et al. A protective effect after clearance of orthotopic rat hepatocellular carcinoma by nanosecond pulsed electric fields[J]. Eur J Cancer, 2014, 50: 2705-2713.
- [7] Qian J, Oppermann E, Tran A, et al. Transarterial administration of integrin inhibitor loaded nanoparticles combined with transarterial chemoembolization for treating hepatocellular carcinoma in a rat model[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22: 5042-5049.
- [8] Wen XD, Reynolds L, Mulik RS, et al. Hepatic arterial infusion of low-density lipoprotein docosahexaenoic acid nanoparticles selectively disrupts redox balance in hepatoma cells and reduces growth of orthotopic liver tumors in rats[J]. Gastroenterology, 2016, 150: 488-498.
- [9] Jin Y, Tong D, Shen J, et al. Establishment of experimental implantation tumor models of hepatocellular carcinoma in Wistar rats[J]. Tumor Biol, 2014, 35: 9079-9083.
- [10] 张学彬,王平,周大勇,等.大鼠 McA-RH 7777 肝细胞癌模型的影像学特征[J].中华肝脏病杂志,2009,17: 59-61.
- [11] Lee TK, Na KS, Kim J, et al. Establishment of animal models with orthotopic hepatocellular carcinoma[J]. Nucl Med Mol Imaging, 2014, 48: 173-179.
- [12] Gholamrezaezhad A, Mirpour S, Geschwind JF, et al. Evaluation of 70-150- μ m doxorubicin-eluting beads for transcatheter arterial chemoembolization in the rabbit liver VX2 tumour model[J]. Eur Radiol, 2016, 26: 3474-3482.
- [13] Lü PJ, Liu J, Yan XP, et al. CT spectral imaging for monitoring the therapeutic efficacy of VEGF receptor kinase inhibitor AG-013736 in rabbit VX2 liver tumours[J]. Eur Radiol, 2017, 27: 918-926.
- [14] Zou Y, Guo CG, Yang ZG, et al. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor efficiently inhibits growth of VX2 cells and VX2 tumor model of hepatocellular carcinoma in rabbit by transarterial embolization-mediated siRNA delivery[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1243-1255.
- [15] Choi JW, Kim JH, Kim HC, et al. Comparison of tumor vascularity and hemodynamics in three rat hepatoma models[J]. Abdom Radiol (NY), 2016, 41: 257-264.

(收稿日期:2017-06-12)

(本文编辑:边 佑)